

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.30.019

妊娠期高血压疾病孕妇胎盘小动脉平滑肌大电导钙激活钾通道表达水平的定量测定*

叶海琼,傅晓冬[△]

(四川医科大学附属医院妇产科,四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 观察妊娠期高血压疾病(HDCP)孕妇胎盘小动脉中大电导钙激活钾通道(BKCa)的蛋白表达,探讨 BKCa 在该疾病发生机制中的作用。**方法** 取 HDCP 孕妇(HDCP 组, $n=15$)与健康孕妇(NT 组, $n=15$)胎盘小动脉平滑肌,用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 BKCa 通道 α 亚基及 β_1 亚基的蛋白水平。**结果** 胎盘小动脉平滑肌检测显示, BKCa 通道 α 亚基在 NT 组的蛋白相对表达量为 $1.028 2 \pm 0.180 6$, HDCP 组为 $1.001 2 \pm 0.169 8$, 差异无统计学意义($P > 0.05$); β_1 亚基在 NT 组的蛋白相对表达量为 $1.616 8 \pm 0.012 6$, HDCP 组为 $0.418 1 \pm 0.080 8$, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** HDCP 胎盘小动脉平滑肌 BKCa 通道 α 亚基蛋白表达无明显变化, β_1 亚基蛋白表达均明显下调。由此推测大电导钙激活钾通道可能参与了 HDCP 的发生、发展, β_1 亚基的异常表达可能是导致 HDCP 血管舒缩功能障碍的一个重要基础。

[关键词] 妊娠期高血压疾病;大电导钙激活钾通道; α 亚基; β_1 亚基

[中图分类号] R714.252

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)30-4229-03

The quantitative determination of BKCa channels in placental arteriole smooth muscle cells of hypertensive disorder complicating pregnancy*

Ye Haiqiong, Fu Xiaodong[△]

(Department of Gynecology and Obstetrics, the Affiliated Hospital of Sichuan Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To observe the change of protein levels of large conductance calcium activated potassium channel (BKCa) in placental arteriole smooth muscle cells from hypertensive disorder complicating pregnancy and discuss its role. **Methods** Western blot analysis was used to examine protein expression of α subunit and β_1 subunit of BKCa channels in placental arteriole smooth muscle cells from hypertensive disorder complicating pregnancy. **Results** The relative protein expression level of α -subunit in the HDCP group was $1.001 2 \pm 0.169 8$ ($n=15$), and the NT group was $1.028 2 \pm 0.180 6$ ($n=15$). There was no significant differences between the two groups ($P > 0.05$); the relative protein expression level of β_1 subunit in the HDCP group was $0.418 1 \pm 0.080 8$ ($n=15$), and the NT group was $1.616 8 \pm 0.012 6$ ($n=15$), the β_1 -subunit protein expression levels of HDCP group were significantly lower ($P < 0.05$). **Conclusion** The protein expression of β_1 -subunit, but not α -subunit, was reduced in placental arteriole smooth muscle cells from hypertensive disorder complicating pregnancy. Therefore, BKCa channel activity may have been involved in hypertensive disorder complicating pregnancy; and the abnormal expression of β_1 subunit maybe an important basis in hypertensive disorder complicating pregnancy.

[Key words] hypertensive disorder complicating pregnancy; large-conductance calcium activated potassium channels; α -subunit; β_1 -subunit

大电导钙激活钾通道 (large-conductance calcium-activated potassium channel, BKCa) 广泛分布于全身如平滑肌、骨骼肌、神经元、肾脏等多种组织中, 在血管平滑肌中的表达尤为丰富, 在血管平滑肌静息电位的维持及血管张力的调节中起着重要的作用, 是血管紧张性的决定因素之一^[1]。BKCa 通道由 α 亚基和 β_1 基构成, α 亚基是 BKCa 通道的基本结构单位, β 亚基有 4 种亚型 $\beta_1 \sim \beta_4$, 其中 β_1 亚基是最先被证实的 BKCa 通道相关蛋白^[2]。妊娠期高血压疾病 (hypertensive disorder complicating pregnancy, HDCP) 是极度威胁孕妇健康的一种妊娠特有性疾病, 有逐年发展的趋势, 其基本病理生理变化是全身

小动脉痉挛, 是一种血管性疾病^[3], 因此推测大电导钙激活钾通道可能与 HDCP 有着不容忽视的联系。本研究通过 Western blot 手段检测健康孕妇和 HDCP 胎盘小动脉平滑肌细胞上大电导钙激活钾通道中 α 亚基和 β_1 亚基的蛋白相对表达量, 从分子水平探讨 BKCa 通道与该疾病的关系, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 HDCP 组: 确诊为 HDCP 并终止妊娠的孕妇 15 例, 平均血压 ($166.50 \pm 17.13/95.80 \pm 11.16$) mm Hg, 平均年龄 (23.7 ± 2.8) 岁; NT 组: 同期终止妊娠的健康孕妇 15 例, 平均血压 (121.17 ± 8.24) mm Hg / (78.27 ± 8.07) mm Hg, 平

均年龄(22.6±2.5)岁。HDPC 组诊断标准参照谢幸主编的第 8 版《妇产科学》。

1.2 仪器与试剂 α 亚基抗体及 β_1 亚基抗体(美国 novus 公司),HRP 羊抗兔二抗及 HRP 羊抗鼠二抗(碧云天公司)。采用的实验仪器主要有:凝胶成像系统(美国 UVP 公司),水平和垂直电泳系统(美国 GE 公司),转印系统(美国 Bio-Rad 公司),滤纸、硝酸纤维素膜(美国 Bio-Rad)。

1.3 方法

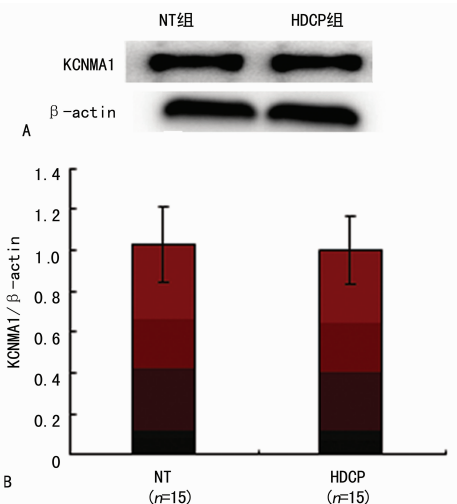
1.3.1 标本处理 选取的病例终止妊娠时,当胎盘娩出后立即取含小动脉的胎盘组织块约 2 cm×2 cm×2 cm,置于 4℃ PPS 中转入实验室。将胎盘组织块在显微镜下选择小动脉,将仔细轻柔分离出的血管迅速放入液氮,然后转入 -70℃ 超低温冰箱冻存。

1.3.2 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 首先配制浓度为 8% 的分离胶、5% 的浓缩胶。液氮冷冻条件下将组织捣碎成粉末,加入蛋白裂解液,分离提取蛋白,加热使蛋白充分变性。随后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和转膜,封闭液封闭,一抗孵育(稀释 BKCa α 及 BKCa β_1 为 1:1 000, β -actin 为 1:2 000)和二抗孵育(羊抗兔 1:4 000,羊抗鼠 1:2 000)后加发光试剂反应,所得条带用于实验分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组采用配对样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胎盘小动脉平滑肌中 BKCa 通道 α 亚基的蛋白表达 在正常孕妇及妊娠期高血压孕妇的胎盘小动脉平滑肌上均有 α 亚基蛋白表达。在 HDPC 组 α 亚基蛋白的相对表达量为 1.001 2±0.169 8,在 NT 组为 1.028 2±0.180 6,两组差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 1。

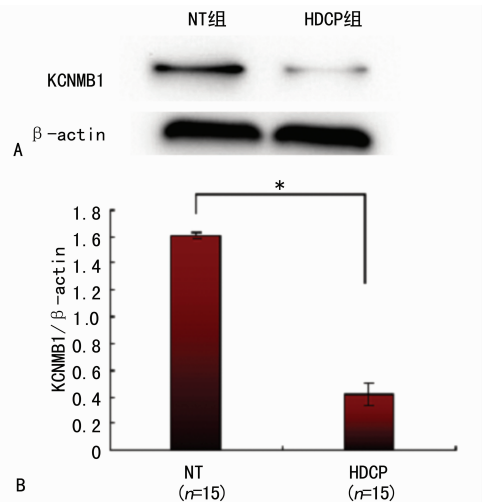


A: Western blot 检测; B: 柱状图。

图 1 两组 BKCa 通道 α 亚基蛋白水平变化图

2.2 胎盘小动脉平滑肌中 BKCa 通道 β_1 亚基的蛋白表达 在正常孕妇及妊娠期高血压孕妇的胎盘小动脉平滑肌上均有 β_1 亚基蛋白的表达。HDPC 组 β_1 亚基蛋白的相对表达量为 0.418 1±0.080 8,NT 组为 1.616 8±0.126 6,差异有统计学

意义($P < 0.05$),见图 2。



A: Western blot 检测; B: 柱状图。

图 2 两组 BKCa 通道 β_1 亚基蛋白水平变化图

3 讨论

HDPC 是一种妊娠期特有的威胁全球孕产妇健康的复杂性疾病,其病因及发病机制至今未明。该疾病被部分学者认为是孕妇的一种血管性疾病,血管舒缩分子调节失衡导致血管通透性增高,从而引起全身多个器官的血管痉挛导致孕妇血压升高、相应器官的缺血缺氧及机体代谢的紊乱。例如,机体正常状态下,调控血管舒缩的细胞因子保持动态平衡,控制机体的血压与局部血流。HDPC 时,引起血管舒张的重要生理因子一氧化氮(NO)的产生与释放功能受到抑制^[4],从而导致血管收缩与舒张因子比例失衡,血管内皮细胞损伤,血压升高。有研究认为,NO 产生的减少是影响该疾病病理生理变化的关键因素,其舒张血管的作用则主要是通过激活 BKCa 通道来实现的。NO 可通过 GC-cGMP-PKG 途径使 BKCa 通道开放,该途径通过磷酸化方式激活而引起血管平滑肌细胞膜超极化,血管平滑肌肌肉松弛,血管扩张,血压下降^[5]。研究发现,血管内皮素 1(ET-1)、前列环素(PGI₂)、血管紧张素-2(Ang-2)等都可能与 BKCa 通道的活性有关,而这些血管活性因子与 HDPC 关系密切^[6]。因此,当 HDPC 发生时,全身血管平滑肌尤其小血管平滑肌上的 BKCa 通道可能表达异常,进而使血管舒缩功能失衡引起血压异常,笔者推测,作为 BKCa 通道重要组成部分的 α 亚基与 β_1 亚基也可能异常表达,因此本研究运用 Western blot 技术检测出 HDPC 孕妇胎盘小动脉平滑肌的 β_1 亚基蛋白表达明显降低,而 α 亚基并没有改变。这提示作为血管平滑肌细胞兴奋的重要调节因素,大电导钙激活钾通道的功能与 β_1 亚基密切相关,与 α 亚基关系并不密切。

大量研究已表明,BKCa 通道在血管平滑肌中高表达,携带了 70%~80% 的外向电流,4 个相同的 α 亚基是其结构单位^[7]。但大鼠实验时,高血压组大鼠 BKCa 通道 β_1 亚基均下调,而 α 亚基并没有变化^[8]。Brenner 等^[9] 进行小鼠实验时敲除了小鼠 β_1 亚基所编码的 KCNMB1 基因,小鼠出现了血管收缩、血压升高。Amberg 等^[10] 观察到在自发性高血压大鼠脑动脉血管平滑肌细胞中 BKCa 通道 β_1 亚基有所减少及通道中钙离子的敏感性有所降低,同时他们应用 RT-PCR 技术分析自发性高血压大鼠脑动脉 BKCa 通道 β_1 亚基的 mRNA 比正常血压大鼠表达降低,而 α 亚基的 mRNA 表达无改变,上述结

果均与笔者实验相吻合。由此,笔者大胆推测 HDPC 时血管平滑肌细胞上 BKCa 通道功能异常主要是由起调节作用的 β_1 亚基的表达量多少来决定, β_1 亚基的异常可能是导致 HDPC 血管功能障碍的一个重要基础, α 亚基虽为通道主要结构,但在高血压疾病中的作用显得微乎其微。

大量证据证明,BKCa 通道在血管平滑肌细胞中的功能障碍与人类高血压息息相关^[11],HDPC 是一种特殊时期特殊类型的高血压也与 BKCa 通道关系密切。BKCa 通道 β_1 亚基在 HDPC 及正常血压状态下均发挥着不容忽视的作用,但其具体作用机制及反馈调节均有待进一步研究。

参考文献

- [1] Toro L,Wallner M,Meera P,et al. Maxi-K(Ca), a unique member of the voltage-gated K channel superfamily[J]. *News Physiol Sci*,1998(13):112-117.
- [2] 郭月玲,韩运峰,张树林. 大电导钙激活钾通道 β_1 亚基与高血压[J]. *中国分子心脏病学杂志*,2009,9(4):250-253.
- [3] 谢幸. 妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2013:64-73.
- [4] Napolitano M,Miceli F,Calce A,et al. Expression and relationship between endothelin-1 messenger ribonucleic acid(mRNA) and inducible/endothelial nitric oxidesynthase mRNA isoforms from normal and preeclampticplacentas[J]. *J Clin Endocrinol Metab*,2000,85(6):2318-2323.
- [5] Mistry DK,Garland CJ,et al. Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca^{2+} -dependent K^+ chan-

nels (BK(Ca)) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery[J]. *Br J Pharmacol*,1998(124):1131-1140.

- [6] Dimitropoulou C,White RE,Fuchs L,et al. Angiotensin II relaxes microvessels via the AT(2) receptor And Ca^{2+} -activated K^+ (BK(Ca)) channels[J]. *Hypertension*,2001,37(2):301-307.
- [7] McCobb DP. A human calcium-activated potassium channel gene expressed in vascular smooth muscle[J]. *Am J Physiol*,1995,269(3 Pt 2):767-777.
- [8] Amberg GC,Santana LF. Downregulation of the BK channel beta1 subunit in genetic Hypertension[J]. *Circ Res*,2003,93(10):965-971.
- [9] Brenner R,Peréz GJ,Bonev AD,et al. Vasoregulation by the β_1 subunit of the calcium-activated potassium channel [J]. *Nature*,2000,407(6806):870-876.
- [10] Amberg GC. Modulation of the molecular composition of large conductance, Ca^{2+} activated K^+ channels in vascular smooth muscle during hypertension[J]. *J Clin Invest*,2003,112(5):717-724.
- [11] Hu XQ. Function and regulation of large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel in vascular smooth muscle cells[J]. *Drug Discov Today*,2012,17(17/18):974-987.

(收稿日期:2015-03-12 修回日期:2015-06-16)

(上接第 4228 页)

- [7] Ma SG, Yang LX, Bai F, et al. Ischemia-modified albumin in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism[J]. *Eur J Intern Med*,2012,23(6):e136-140.
- [8] Eriksi AA,Karagoz B,Ozturk A,et al. The effect of sub-clinical hypothyroidism on platelet parameters[J]. *Hematology*,2009,14(2):115-117.
- [9] 刘蓉,杨跃进,乔树宾,等. 高敏 C 反应蛋白对急性 ST 段抬高型心肌梗死患者近期预后的预测价值[J]. *中国循环杂志*,2011,26(1):19-22.
- [10] Kontny E,Plebanezyk M,Lisowska B,et al. Comparison of rheumatoid articular adipose and synovial tissue reactivity to proinflammatory stimuli:contribution to adipocytokine network[J]. *Ann Rheum Dis*,2012,7(2):262-267.
- [11] Kim HJ,Park SY,Choi YJ,et al. Differential significance of plasma visfatin concentrations according to adiposity in children and adolescents[J]. *Horm Res Paediat*,2013,79(4):208-213.
- [12] Romacho T,Villalobos LA,Cercas E,et al. Visfatin as a

novel mediator released by inflamed human endothelial [J]. *PloS One*,2013,8(10):e78283.

- [13] Jürimäe J,Gruodyte R,Saar M,et al. Plasma visfatin and adiponectin concentrations in physically active adolescents girls:relationships with insulin sensitivity and body composition variables[J]. *JPEM*,2011,24(7):419-425.
- [14] Ozkaya M,Sahin M,Cakal E,et al. Visfatin plasma concentrations in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism before and after control of thyroid function[J]. *J Endocrinol Invest*,2009,32(5):435-439.
- [15] Caixàs A,Tirado R,Vendrell J,et al. Plasma visfatin concentrations increase in both hyper and hypothyroid subjects after normalization of thyroid function and are not related to insulin resistance,anthropometric or inflammatory parameters[J]. *Clin Endocrinol(Oxf)*,2009,71(5):733-738.

(收稿日期:2015-03-28 修回日期:2015-06-22)

欢迎投稿

欢迎订阅